

Diseño y construcción de un sensor electroquímico para la detección enantioselectiva de triptófano usando un electrodo de oro modificado con polipirrol sobreoxidado mediante la tecnología de impresión molecular (MIP)

Allan Montenegro[†]; Walter Torres Hernández[†]

[†]Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali, 25360 Cali, Colombia.

RESUMEN: En este trabajo se diseñó un sensor amperométrico para la detección altamente selectiva de L-triptófano, por medio de la tecnología de impresión molecular sobre polímeros conductores (MIP). El sensor consiste en un electrodo de oro modificado con una película de polipirrol sobreoxidado sobre la cual se generaron impresiones moleculares de L-triptófano, (Au/oPPy,PSS,Trp). El sensor presentó respuestas electroquímicas diferentes para el electrodo sin modificar (Au), para el electrodo modificado sin impresión molecular (Au/oPPy,PSS) y para el electrodo modificado con las impresiones moleculares (Au/oPPy,PSS,Trp). Estos resultados demuestran el papel fundamental que desempeña el proceso de impresión molecular en el aumento de la capacidad de reconocimiento específico del sensor, además de un efecto electrocatalítico. El proceso de optimizar las condiciones electrosintéticas se realizó por voltamperometría cíclica y para estudiar atributos analíticos se utilizó voltametría de pulso diferencial. Finalmente con las mejores condiciones encontradas se sintetizó un sensor que da una respuesta lineal entre 1,0 mM y 35,0 mM que ofrece un límite de detección de 0,33 mM, y variabilidades menores a 4,4 %.

Palabras clave: Sensor amperométrico, polímeros conductores, polímeros impresos molecularmente, L-Triptófano, Voltametría de pulso diferencial (VDP), Voltametría Cíclica (VC).

ABSTRACT: In this paper an amperometric sensor for highly selective detection of L-tryptophan was designed, through molecular imprinting technology on conductive polymers (MIP). The sensor consists of a modified gold electrode with overoxidize polypyrrole film on which molecular prints to the L-tryptophan were generated, (Au/oPPy,PSS,Trp). The sensor presented different responses electrochemical for unmodified electrode (Au), for the modified electrode without molecular imprinting (Au/oPPy,PSS) and for the modified electrode with molecular impressions (Au/oPPy-Trp). These results demonstrate the fundamental role of molecular imprinting process in increasing the capacity of specific recognition of the sensor, plus an electrocatalytic effect. The process of optimizing electrosynthesis conditions was performed by cyclic voltammetry and to study analytical attributes was used differential pulse voltammetry. Finally, was synthesized a sensor using the best conditions that gives a linear response between 1.0 mM and 35.0 mM, offering a detection limit of 0.33 mM and smaller variabilities 4.4%.

Keywords: Electrochemical sensor, Conductive polymers, Molecularly imprinted polymers, Tryptophan, Differential Pulse Voltammetry (DPV), Cyclical Voltammetry (CV)

1. INTRODUCCIÓN

Los polímeros con impresión molecular (MIPs) son polímeros altamente entrecruzados con propiedades de

reconocimiento molecular selectivo hacia los compuestos para los cuales fueron generados¹. El concepto MIPs, que ha sido estudiado desde la década de 1990², encuentra aplicaciones en procesos cromatográficos de separación incluyendo separaciones quirales³ y extracción en fase sólida⁴. Estos polímeros impresos son útiles como medios de soporte en síntesis y en catálisis heterogénea⁵, en la liberación controlada de productos farmacéuticos⁶ y en el reconocimiento de proteínas y otras macromoléculas⁷. Y finalmente, son una plataforma para el desarrollo de sensores⁸⁻⁹. Para la construcción de sensores, los métodos para fabricar MIPs son diversos e incluyen electropolimerización¹⁰, auto-ensamblaje molecular (SAMs)¹¹, técnicas de litografía superficial¹² e injertos químicos¹³. Los métodos electroquímicos de síntesis son particularmente atractivos porque es posible controlar las dimensiones de los polímeros producidos y porque estos métodos son compatibles con tecnologías de fabricación de circuitos integrados¹⁴.

Polímeros orgánicos con una conjugación extendida, por ejemplo, polipirrol (PPy) y polianilina (PANI) son materiales conocidos por su habilidad de transportar iones y electrones. PPy es un polímero conductor modelo para la producción de MIPs, debido a la facilidad y bajo costo de producción y biocompatibilidad. Es útil para la inmovilización y detección de compuestos con actividad biológica¹⁵. Los polímeros conductores pueden pasar de un estado aislante (vía reducción, conductividad típica $<10^{-5}$ S/cm) a un estado conductor electrónico (vía oxidación, conductividad típica entre 10^1 y 10^4 S/cm) en forma reversible, mediante control electroquímico. Pueden ser transportadores aniónicos o catiónicos dependiendo de las condiciones de síntesis. Pueden pasar del estado oxidado (conductor) a un estado sobre-oxidado, en el cual el material se convierte en un aislante electrónico. La sobreoxidación de PPy envuelve la introducción de grupos hidroxilo y carbonilo en los monómeros¹⁶, rompiendo la conjugación, lo que disminuye la conductividad electrónica varios órdenes de magnitud pero conservando la capacidad de transporte iónico.

Los sensores electroquímicos con el concepto de impresión molecular son ahora de gran interés como alternativa para la detección de moléculas de interés biológico¹⁷ que son detectadas en su mayoría por biosensores (sensor donde el elemento de reconocimiento es un material biológico, enzima, ADN, ARN, anticuerpo,

etc)^{18,19}. La aceptación de la plataforma analítica MIPs se debe a su relativa insensibilidad a cambios de pH, temperatura, y humedad. Adicionalmente, las metodologías de preparación son sencillas y pueden ser automatizadas para generación en masa de estos dispositivos²⁰, además de la posibilidad de preparar multisensores compatibles con la tecnología de microfluidos y *lab on a chip*, útiles para la implementación en medicina del concepto de diagnóstico en el punto de atención (*point of care diagnostics*).

Una demanda creciente en ciencias clínicas es el análisis rápido, selectivo de aminoácidos. Estas moléculas son las unidades estructurales que forman las proteínas; asumen importantes papeles en la función neurotransmisora. La detección y cuantificación de aminoácidos (libres y en cadenas peptídicas) es de gran importancia en medicina, la industria farmacéutica, de alimentos y de abonos²¹.

El triptófano (Trp) es uno de los aminoácidos esenciales en la nutrición humana y de mayor interés en los análisis clínicos. Debido a que promueve la liberación del neurotransmisor serotonina (5-hidroxitriptamina) precursor de la hormona melatonina, vital para regular el ciclo diario de sueño-vigilia²². Trp es usado para el tratamiento de la ansiedad y la depresión. Uno de los tratamientos más conocidos corresponde a los problemas de obesidad donde el componente ansioso es muy importante (por ejemplo en bulimias)²³.

Este artículo presenta el diseño y construcción de un sensor electroquímico bajo el concepto de impresión molecular, el cual presentó enantioselectividad al ser evaluado frente a las dos especies de aminoácido, adicionalmente el sensor demostró efecto electrocatalítico para la oxidación de L-Trp.

2. EXPERIMENTACIÓN

2.1. Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico: L-Trp (Alfa Aesar)[73-22-3], D-Trp (Sigma) [14C-1350], polisulfonato de estireno, sal de sodio (PSS) MW 70.000 daltons (Aldrich) [25704-18-1], pirrol (Py: Alfa Aesar)[109-97-7]. H₂SO₄ (98.0 %, Mallinckrodt AR®), NaOH 99.8% (Macron) [7708-12], KCl 3.0 M (Mol LABS LTDA), solución reguladoras pH 4.0; pH 7.0; pH 10.0 (Panreac), Na₂HPO₄ (Fisher Scientific) [7558-79-4], NaH₂PO₄ (Merck) [10049-21-5]. Todas las soluciones se prepararon

con agua desionizada obtenida de un purificador Millipore-MilliQ con una resistividad de $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$.

2.2. Instrumentos

Los experimentos de voltamperometría cíclica (VC) y de pulso diferencial (VDP) se registraron en una estación electroquímica CHI 760B (CH Instruments, Inc., USA) utilizando una caja de Faraday (CH Instruments, Inc. USA). Las medidas electroquímicas se realizaron en una celda convencional de tres electrodos en la que se utilizó como electrodo de trabajo un disco de oro ($\varnothing = 1.6 \text{ mm}$) (MF-2014 de Bioanalytical Systems), una lámina de platino de 1.2 cm^2 como electrodo auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl (Sat. KCl 3.0 M) como electrodo de referencia. Todas las medidas electroquímicas se llevaron a cabo purgando las soluciones con nitrógeno de alta pureza y bajo las condiciones ambientales de la ciudad de Santiago de Cali (Temperatura entre 296 K y 300 K y presión atmosférica entre 100.90 y 100.98 kPa).

2.3. Preparación del sensor amperométrico

2.3.1 Limpieza de la superficie electródica

Para electrosintetizar el sensor primero se eliminaron las impurezas de la superficie metálica (oro) realizando un pulido mecánico con un kit de pulido CHI120, el cual contenía alúmina de $1.0 \mu\text{m}$ y $3.0 \mu\text{m}$ de diámetro y almohadilla de Nylon de 73 mm. Inicialmente se utilizó la alúmina de mayor diámetro y posteriormente la de menor, luego se lavó con agua destilada. Para retirar los residuos de alúmina de la superficie, el electrodo se sometió a vibración ultrasónica a temperatura ambiente por 20 minutos. Después, se somete a limpieza electroquímica en solución acuosa de ácido sulfúrico 0.01 M, barriendo el potencial de celda desde -1.8 V hasta 1.6 V vs Ag/AgCl a 50 mV/s durante 40 ciclos hasta observar voltamogramas reproducibles

2.3.2 Determinación del área efectiva del electrodo

Este experimento consistía en realizar voltametría cíclica a una solución de ferrocianuro 6.0 mM en KNO_3 0.1 M variando las velocidades de barrido (desde 20 hasta 150 mV s^{-1}). Con las señales obtenidas y algunos valores obtenidos de la literatura como el coeficiente de difusión para la especie en solución se calcula el área real del electrodo (sección 3.1)

2.3.3 Electrosíntesis del polímero conductor

Una vez se tenía limpia la superficie del electrodo, se llevó a cabo la polimerización del monómero en solución acuosa que contiene Pirrol (Py, 0.1 M), poli sulfonato de estireno, sal de sodio (PSS, 0.50 g en 250.0 mL \approx 0.01 M de unidades monoméricas) y L-Trp 4.0 mM. El pH de la solución fue regulado a 6.0 con regulador de fosfatos (0.05 M). El proceso electrosintético se realizó a un potencial constante de 0.8 V vs Ag/AgCl por 60 s.²⁴

2.3.4 Sobreoxidación del polímero – generación de cavidades moleculares

Posterior a la electrogeneración de la película de PPy / L-Trp sobre la superficie del electrodo, se realiza un proceso de sobreoxidación química y electroquímica con dos propósitos; generar mayor estabilidad mecánica en la red polimérica por medio de entrecruzamiento del polímero sintetizado y forzar la salida de las moléculas plantilla de L-Trp, de esta manera se generan las cavidades complementarias en tamaño y forma a la molécula objetivo (L-Trp)²⁴.

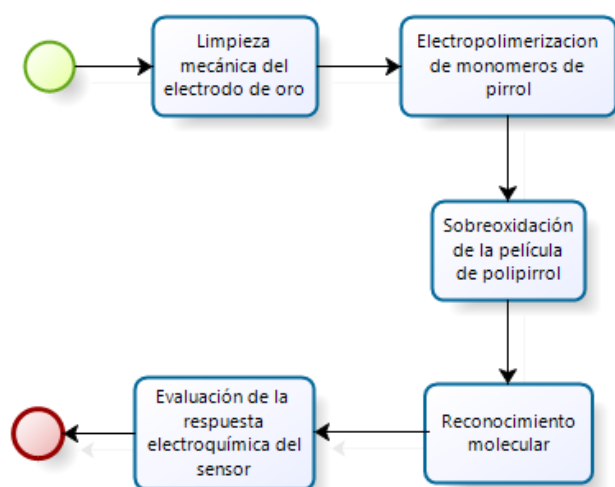
Esta sobreoxidación se realiza sumergiendo el electrodo de trabajo modificado en una solución de NaOH 0.1 M, para luego ser sometido a un potencial constante de 1.0 V vs Ag/AgCl durante 60 s. Se sintetizaron sensores de control que consistían en realizar la síntesis anteriormente mencionada, pero en ausencia de la molécula plantilla los cuales fueron denominados N-MIP²⁵⁻²⁶.

Es sabido que la molécula de Trp se oxida en alkali aun a temperatura ambiente, pero la finalidad de este proceso es retirar la molécula de Trp de la plantilla, oxidándola; de esta manera se generan las cavidades complementarias de la molécula²⁷.

2.3.5 Evaluación de reconocimiento molecular y enantioselectividad del sensor generado

Una vez realizado el proceso de sobreoxidación, el MIP electrogenerado es sumergido en una solución acuosa que contiene PSS 0.5 g en 250 mL y L-trp 4.0 mM, el pH de la solución se reguló a 6.0 con solución reguladora fosfatos y se burbujeo nitrógeno dentro de la solución por 10 minutos para minimizar el oxígeno disuelto en la solución. Bajo condiciones de circuito abierto se sumergió el electrodo por 20 min, esto con el fin de permitir la difusión del aminoácido desde la solución hasta las

cavidades moleculares presentes en la matriz polimérica (acoplamiento). Después de los 20 minutos, se cierra el circuito y se realiza un barrido de potencial desde 0,5V hasta 1,2 V vs Ag/AgCl aplicando voltametría de pulso diferencial. El estudio sobre la enantioselectividad del MIP se realiza en similares condiciones, solo que se reemplaza el aminoácido L-trp por D-trp.²⁴. Este estudio se realizó para diferentes concentraciones de molécula plantilla (en el rango 5,0 mM a 35,0 mM). Con esta información se calcularon las concentraciones límites del sensor.



Esquema 1: Diagrama de flujo de las etapas de la metodología utilizada para la preparación y evaluación del sensor electroquímico²⁸.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación del área electroactiva del electrodo

Usando un sistema reversible de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ en KNO_3 , donde es posible oxidar el complejo ferroso mediante un barrido en sentido anódico y posteriormente reducir el complejo férrico con un barrido de potencial en sentido inverso, graficando la intensidad de corriente de los picos anódicos en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y usando la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 1), se calculó el área electroactiva del electrodo de trabajo.

$$I_{pa} = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C \sqrt{D \nu}$$

Ec 1

Donde I_{pa} es la corriente de pico anódico, n es el número de electrones transferidos, A es el área del electrodo en cm^2 , D es el coeficiente de difusión para la especie

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ($6,22 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, a 25°C), C es la concentración del ferrocianuro de potasio en moles cm^{-3} y ν es la velocidad de barrido en V s^{-1} .

Se obtuvo un área de 2.05 mm^2 contra 2.01 mm^2 de área geométrica. La diferencia se debe a la rugosidad del electrodo²⁹.

3.2 Evaluación del comportamiento electroquímico del aminoácido sobre el electrodo de oro sin modificar y modificado

La Figura 1 muestra la respuesta electroquímica que se genera en un electrodo de Au si modificar, electrodo modificado sin plantilla molecular (Au/oPPy,PSS) y electrodo modificado con plantilla para el aminoácido (Au/oPPy,PSS,L-Trp) en una solución de L-Trp 4.0 mM, pH 6.0 en buffer fosfatos. La velocidad de barrido para los análisis es de 20.0 mV s^{-1} .

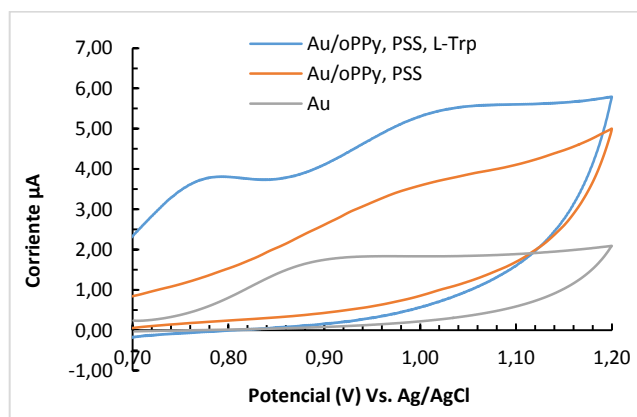
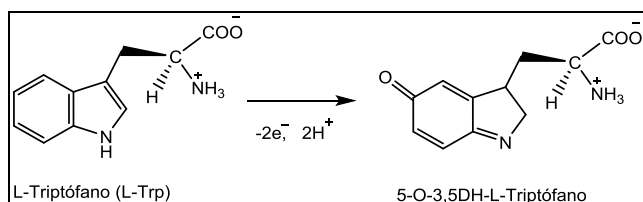


Figura 1. Voltamogramas cíclicos sobre electrodo de Au, Au/oPPy,PSS, Au/oPPy,PSS,L-Trp en solución L-Trp 4.0 mM, pH 6.0 en buffer fosfatos. Velocidad de barrido = 20.0 mV s^{-1} .

En el voltamograma Au se observa un pico de oxidación a 0.90 V , atribuido a la formación de 5-O-3,5-DH-L-Trp, a partir del aminoácido L-Trp sobre el metal³⁰. En el voltamograma Au/oPPy,PSS no hay un pico de corriente definido pero se observa una corriente generada hacia 1.0 V , lo cual puede ser explicado de dos maneras; como un producto del PPy que no se sobreoxido en el paso anterior o como la electrooxidación de las moléculas de L-Trp que han llegado hasta la superficie del electrodo por medio de orificios en el polímero, este proceso requiere de una mayor cantidad de energía, lo cual genera un corrimiento del potencial de oxidación hacia valores más positivos. El voltamograma Au/oPPy,PSS, L-Trp, evidencia una corriente definida hacia 0.75 V . lo cual permite establecer

el reconocimiento molecular de la especie L-Trp en el polímero, adicionalmente se observa una corriente capacitiva muy alta hacia valores más positivos lo cual puede tener dos explicaciones como se vio anteriormente. Otros autores mostraron que la electro-oxidación de Trp ocurre a través de transferencia de 2 electrones y 2 protones (Esquema 2)³¹.



Esquema 2: Estructura formada por la oxidación electroquímica de L-Trp³⁰.

El efecto de la velocidad de barrido sobre el Ipa y el Epa de la solución de L-Trp 10.0 mM + PSS (0.01 M en monómero) se examina en la Figura 2, donde se determina que la velocidad de barrido tiene influencia sobre los Epa; por tanto, se establece que el proceso de electrooxidación es irreversible³².

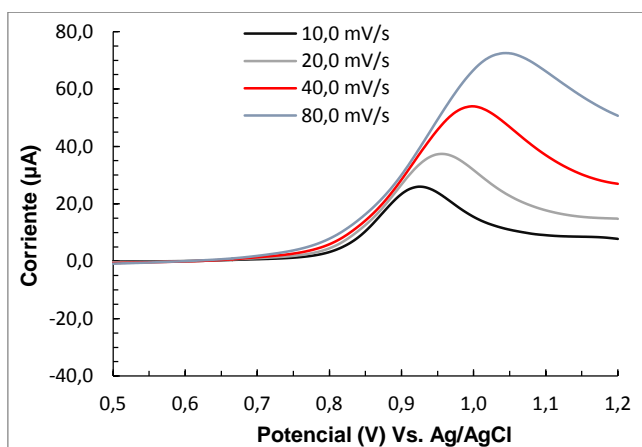


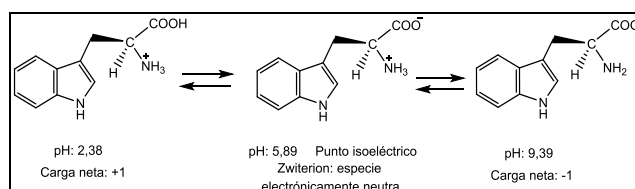
Figura 2. Voltametría de barrido lineal sobre electrodo de Au sin modificar, para solución L-Trp 10.0 mM + PSS (0.01 M en monómero), pH 6,0 en buffer fosfatos, Velocidades de barrido de potencial; 10, 20, 40, 80 mV s⁻¹, vs Ag/AgCl.

En la figura 2 se observa que la velocidad de barrido durante el análisis tiene influencia sobre la altura de la corriente y sobre el potencial de pico anódico, este efecto se debe a que con el aumento de la corriente, existe un incremento en el valor de la caída ohmica (IR) para el circuito, produciendo un aumento en el valor del potencial de oxidación. Adicionalmente, la corriente total que se registra en las medidas por voltametría cíclica

viene dada por las contribuciones farádicas y de la carga que se desarrolla en la doble capa.

3.3 Efecto del pH de síntesis sobre la respuesta del sensor

En el primer paso de polimerización, el pirrol se oxida para formar un catión radical que se puede unir, ya sea a otro catión radical para generar un dímero de carga 2+ o a una molécula de pirrol para formar un dímero catión radical³³. Independiente del mecanismo, dado que la oxidación del monómero viene acompañada por liberación de protones, la acidez del medio influye en la velocidad de polimerización y es sabido que modula el comportamiento de los sensores basados en PPy. A su vez, Trp tiene dos pKa (pKa1 = 2.38 y pKa2 = 9.39) y tres especies, como parece en la imagen 2³⁴.



Esquema 3: Estructuras del aminoácido L-Trp relacionadas con el pH de la solución a 25 °C³⁴.

Polimerización en el rango de pH ente 4 y 8, ocurre en un medio en el que la especie predominante de Trp es un zwitterion.

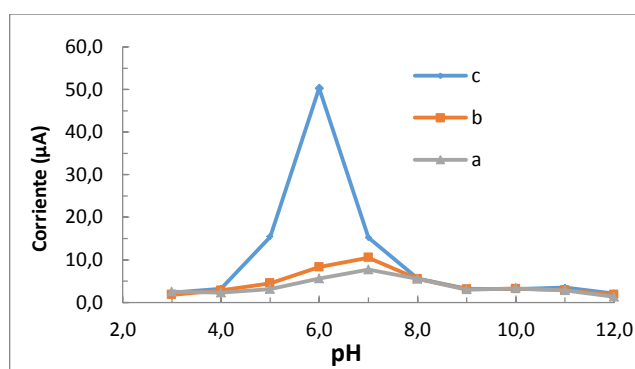


Figura 3. Respuesta electroquímica de electrodos de (a) Au, (b) Au/oPPy, PSS y (c) Au/oPPy, PSS, L-Trp en soluciones de L-Trp 10,0 mM en PSS 0.01 M (20 mV/s), pH 6,0 en buffer fosfatos. En función del pH de la solución de electrosíntesis de PPy.

La Figura 3 muestra que la respuesta voltamétrica del sensor aumenta drásticamente cuando la polimerización se hace a pHs cercanos al punto isoelectrico de Trp, sugiriendo que la forma zwitterión del aminoácido favorece la formación de plantillas moleculares. Sin embargo, esto no explica por qué la respuesta del sensor

preparado a pH 5 y 7 es tan baja. Aun para la síntesis del polímero a pH 8, el 96% de las moléculas de Trp estarán en forma de zwitterion y aprox el 4 % en forma de anión.

3.4 Respuesta electroquímica del sensor en función del tiempo de polimerización

Estudios en los años 80's mostraron que, durante la polimerización de Py sobre electrodos de área no mayor que 1 cm^2 , para películas delgadas de hasta cerca de $1 \mu\text{m}$ de espesor, el espesor de la película polimérica es proporcional al tiempo de polimerización, siempre y cuando el potencial usado para la polimerización no supere 0.8 V vs Ag/AgCl. Al aumentar el espesor, la conductividad electrónica de PPy disminuye y la eficiencia de la película polimérica empieza a disminuir debido a caídas de potencial en el material³⁵. La figura 4 muestra las corrientes de pico anódico de sensores de Au/oPPy-L-Trp en función del tiempo de polimerización a un potencial constante de 0.8 V .

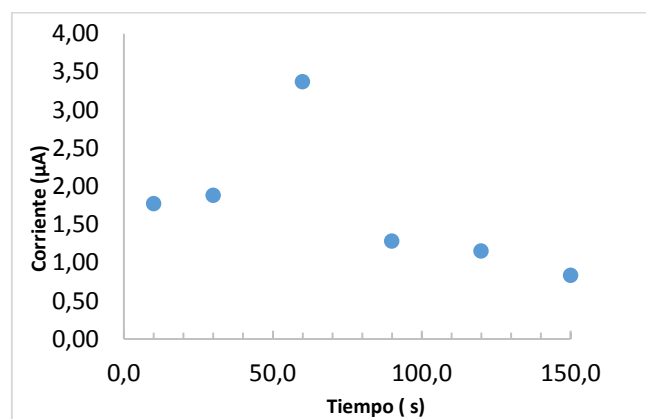


Figura 4. Respuesta electroquímica de un electrodo de Au en una solución de, PSS (0.01 M en monómero), 4.0 mM L-Trp, pH 6.0 en buffer fosfatos, (20 mV/s). En función del tiempo de polimerización con potencial constante de 0.8 V vs Ag/AgCl en el intervalo entre 10 y 150 s .

La respuesta de los sensores de oPPy-Trp preparados por electro-síntesis a potencial constante en el rango aproximado entre 0 y 60 s de polimerización, aumenta en forma cuasi lineal con el tiempo de polimerización. Uno puede estimar el espesor de las películas por medio de la ecuación 2.

$$\text{Espesor} = \frac{CM}{Fn d A}$$

Ec 2

Donde C es la carga de polimerización (en C), M es la masa molar de monómero (g/mol), F es la constante de

Faraday (96500 C/mol e^-), n es el número de electrones involucrados en la formación y oxidación del polímero ($2.25 \text{ e}^-/\text{monómero}$), d es densidad de PPy oxidado (1.2 g/cm^3) y A es el área del electrodo ($2.05 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$).

Para la película preparada en 60 s , la carga de polimerización es $2.479 \times 10^{-4} \text{ C}$ y el espesor estimado mediante la ecuación 2 es $3.0 \mu\text{m}$. Otros estudios han mostrado que este estimado tiene una incertidumbre asociada de aproximadamente $\pm 20\%$. Un mejor estimado del espesor de las películas puede hacerse mediante profilometría.

3.5 Reconocimiento molecular del sensor

La actividad del sensor electroquímico de Au/(oPPy, L-Trp) fue evaluada sumergiendo los electrodos modificados en una solución acuosa de L-triptófano 4.0 mM , a pH 6.0 regulado con buffer fosfato, por 20 min . Este proceso se realizó para garantizar un enriquecimiento del analito en el sensor. Pasado este tiempo, el sensor fue sometido a un barrido de potencial entre 0.7 y 1.2 V vs Ag/AgCl, utilizando voltametría de pulso diferencial como técnica de evaluación. Las respuestas electroquímicas obtenidas aparecen en las Figura 5.

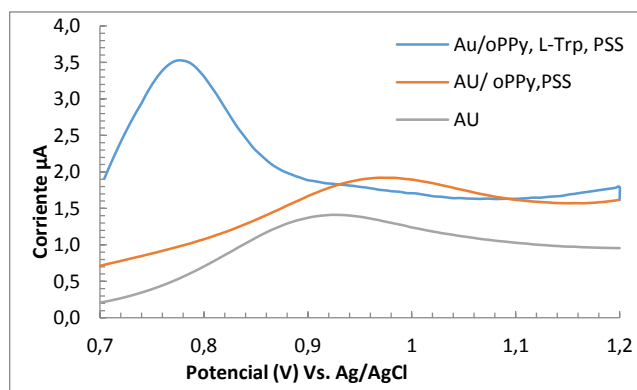


Figura 5. VDP para a) Au b) Au/oPPy, PSS y c) Au/oPPy-L-Trp, PSS en solución de 3.5 mM L-Trp en 0.05 M PBS (pH=6.0). Amplitud de pulso 0.05 V , ancho de pulso 0.05 s , incremento de potencial 0.004 V .

En la figura anterior se observa las corrientes de pico anódico que se obtienen con cada sensor. La respuesta electroquímica del sensor modificado impreso molecularmente (línea azul en la figura 5) demuestra una marcada preferencia del sensor hacia el L-aminoácido en comparación con el electrodo de oro y el sensor modificado con polipirrol sobreoxidado pero que no tiene

impresiones moleculares (Au/(oPPy)), ya que las corrientes para los MIPs son 1,8 veces mayores que en las plantillas sin impresiones y 2,5 veces mayor en comparación con el electrodo de oro. Otro aspecto importante es el considerable aumento de la corriente de oxidación y el corrimiento del pico anódico a menores potenciales, estos comportamientos claramente ilustran el fenómeno electrocatalítico de la superficie de los electrodos modificados con oPPy que tienen las cavidades moleculares de los aminoácidos, es decir; que la película formada con la plantilla realmente sirve de mediador de la reacción de oxidación. En otras palabras, la película con impresión molecular disminuye la energía de activación de la reacción de oxidación de Trp.

3,6 Evaluación de la respuesta del sensor para diferentes concentraciones de L-Trp

En la figura 6 se muestra la respuesta electroquímica para diferentes concentraciones de L-Trp en el sensor modificado (Au/oPPy-L-Trp). El aumento de la concentración del aminoácido da lugar a un aumento de corriente.

Para ello se estudia la relación lineal entre la concentración del aminoácido y la corriente, con la siguiente expresión de la ecuación de regresión lineal: $I_{pa} = 1,8689 C_{L-Trp} + 1,2351$ ($R^2=0,9908$) cuando el rango de linealidad va desde 1,0 a 35,0 mM como se observa en la figura 6.

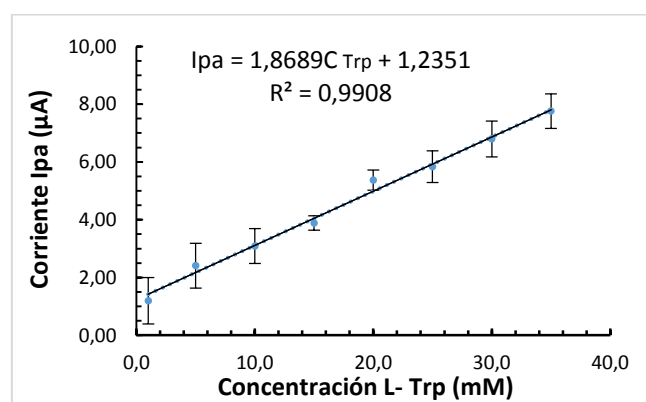


Figura 6. Respuesta lineal del pico de corriente de L-Trp usando el sensor electroquímico impreso molecularmente (Au/oPPy, PSS, L-Trp) en el rango de 1,0 a 35,0 mM.

El límite de detección para el sensor es 0,33 mM y el límite de cuantificación es de 1,13 mM y para calcularlos se usaron las siguientes definiciones $LDD=3S_b /q$,

$LDQ=10S_b /q$; donde S_b es la desviación estándar de la señal de la corriente de oxidación emitida por una solución de 1,0 mM de L-Trp (punto más bajo de la curva), y q es la pendiente de la curva de calibración³⁶. Para verificar la repetibilidad del sensor electroquímico se midieron 10 veces las corrientes de pico de oxidación en una solución de 20,0 mM L-Trp (Nivel intermedio de la curva de calibración) usando la técnica VDP y el mismo sensor modificado, el resultado mostró una desviación estándar relativa (RSD) de 4,4%.

Comparando el límite de detección calculado en este trabajo, nos damos cuenta que está por encima de los valores reportados en literatura (tabla 1)³⁷, por tanto, una de las perspectivas es seguir buscando las condiciones adecuadas para disminuir el valor de este límite.

Tabla 1: Comparación del método propuesto con otros previamente reportados en la literatura

Electrodo	Modificación	Técnica	pH	Rango lineal (µM)	Límite de Detección (µM)	Referencias
CP	****	DPV	7.4	3-30	1.7	Fiorucci and Cavaleiro(2012)
GC	Hemin	DPV	3.0	0.1-100	0.025	Nan et (2002)
GC	Buch	A	7.0	2-60	0.6	Jin and Lin (2004)
BDD	****	DPV	11.2	20-1000	10	Zhao et al. (2006)
CP	MWCNT/CoSal	DPV	4	0.5-50	0.1	Shahrokhan and Fatouhi (2007)
CILE	GNP	SWV	7.0	5-900	4.0	Safavi and Momeni (2010)
AU	oPPy/ PSS, L-Trp,	DPV	6.5	1000 - 35000	300	En este trabajo(2016)

4. CONCLUSIONES

Usando el concepto de impresión molecular en polímeros (MIP) se fabricó un sensor amperométrico para L-Trp, modificando la superficie de un electrodo de oro con una película de oPPy con cavidades complementarias a la forma de L-Trp.

El uso de Py para la oxidación del L-Trp tiene un marcado efecto electrocatalítico ya que desplaza el valor del potencial de oxidación a valores más bajos. Sin embargo, el mecanismo de transferencia de electrones entre y la superficie de Au no es claro aún. Si la densidad de sitios activos (cavidades) en el polímero es lo suficientemente alta, un mecanismo probable de conducción de electrones entre Trp atrapado en la matriz y el electrodo de Au es el llamado “salto de electrones” (hopping) que ocurre en películas de polímeros electroactivos que no son conductores electrónicos, por ejemplo, polivinilferroceno.

La respuesta electroquímica del sensor para L-Trp en solución depende del tiempo y el pH de polimerización. Sin embargo, otros factores, no estudiados en el presente

trabajo, por ejemplo, la temperatura de polimerización, el mecanismo de transporte de masa hacia el electrodo durante la polimerización y las condiciones de sobreoxidación ameritan estudio porque pueden alterar la densidad de sitios activos (cavidades) en la película polimérica.

La selectividad observada del sensor por la especie L-Trp en comparación con D-Trp es conocida en la literatura pero el mecanismo por el cual una molécula quiral introduce quiralidad en MIPs se encuentra en investigación. Muchos autores recurren a un modelo en el que la molécula plantilla (en nuestro caso, L-Trp) forma un complejo con moléculas del monómero antes de empezar la polimerización. De formarse este precomplejo y ser estable durante polimerización, la dirección de crecimiento tridimensional del polímero estaría controlada desde el tiempo cero de polimerización. Experimentos de fluorescencia realizados en nuestro grupo (no discutidos aquí) muestran claramente que tal pre-complejo no se forma entre moléculas de L-Trp y Py en solución bajo nuestras condiciones experimentales. La formación de centros quirales en PPy debe entonces ocurrir durante la polimerización. La formación de una cavidad complementaria requiere de al menos tres sitios de interacción entre la molécula plantilla y el polímero huésped. Sin embargo, la formación de un sitio quiral requiere más de tres interacciones intermoleculares las cuales son por naturaleza, de tipo van der Waals. Dada la baja magnitud de la energía estas interacciones y la alta velocidad de electropolimerización de Py, el mecanismo de formación de sitios quirales en PPy no es, de lejos, un asunto resuelto.

INFORMACIÓN DEL AUTOR

Correspondencia del Autor

allan.montenegro@correounivalle.edu.co

Fuentes de Financiación

Este proyecto de investigación fue financiado por el Grupo de Electroquímica de la Universidad del Valle

AGRADECIMIENTOS

EL Autor manifiesta su agradecimiento al Departamento de Química de la Universidad del Valle (Cali-Colombia) y su grupo docente, por la formación académica recibida. Al profesor Walter Torres Hernández por su dirección y paciencia durante este proyecto, gracias por la confianza

depositada desde que solicite el ingreso al grupo de investigación. A mis compañeros de carrera y laboratorio con quienes compartí conocimiento y momentos. A almacenes Éxito por darme la oportunidad laboral para que mi sueño profesional pueda cumplirse.

DEDICATORIA

A mi familia por ser siempre mi energía de activación cada vez que sentía desfallecer y a Tatiana García a quien considero mi compañera de viaje.

ABREVIACIONES

Trp, Triptófano; Au, Sensor electroquímico sin modificar; Au/oPPy, Sensor electroquímico modificado sin impresión molecular; Au/oPPy-L-Trp, Sensor electroquímico modificado con impresión molecular para L-Triptófano; VDP, Voltametría de pulso diferencial; VC, Voltametría Cíclica; LDD, Limite de detección; RSD, Desviación estándar relativa

REFERENCIAS

- 1 Del Cacho, C. Polímeros de Impresión Molecular Para Determinación de Pesticidas, Complutense de Madrid, **2009**, 15-18
- 2 Tokonami, S.; Shiigi, H.; Nagaoka, T. Review: Micro- and Nanosized Molecularly Imprinted Polymers for High-Throughput Analytical Applications. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *641*, 7-13.
- 3 Kriz, D.; Ramström, O.; Mosbach, K. Molecular Imprinting: New Possibilities for Sensor Technology. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 345A-349A.
- 4 Özcan, L.; Sahin, M.; Sahin, Y. Electrochemical Preparation of a Molecularly Imprinted Polypyrrole-Modified Pencil Graphite Electrode for Determination of Ascorbic Acid. *Sensors* **2008**, *8*, 5792-5805.
- 5 Prasad, Bhim Bali, Mahavir Prasad Tiwari, Rashmi Madhuri, P. S. S. Enantioselective Separation and Electrochemical Sensing of D- and L-Tryptophan at Ultratrace Level Using Molecularly Imprinted Micro-Solid Phase Extraction Fiber Coupled with Complementary Molecularly Imprinted Polymer-Fiber Sensor. *J. Chromatogr.* **2011**, *879*, 364-370.
- 6 Visnjovski, A.; Schoma, R.; Yilmaz, E.; Bru, O. Catalysis of a Diels-Alder cycloaddition with differently fabricated molecularly imprinted polymers. *Catal. Commun.* **2005**, *6*, 601-606

- 7 Hiratani, H.; Mizutani, Y.; Alvarez-Lorenzo, C. Controlling Drug Release from Imprinted Hydrogels by Modifying the Characteristics of the Imprinted Cavities. *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 728–733
- 8 Ramanaviciene, A.; Ramanavicius, A. Molecularly Imprinted Polypyrrole-Based Synthetic Receptor for Direct Detection of Bovine Leukemia Virus Glycoproteins. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 1076–1082.
- 9 Malitesta, C.; Losito, I.; Zambonin, P. G.; Chimica, D.; Orabona, V.; Bari, I.-. Polymers: New Materials for Biomimetic Sensors. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1366–1370
- 10 Kan, X.; Xing, Z.; Zhu, A.; Zhao, Z.; Xu, G.; Li, C.; Zhou, H. Molecularly Imprinted Polymers Based Electrochemical Sensor for Bovine Hemoglobin Recognition. *Sensors Actuators, B Chem.* **2012**, *168*, 395–401.
- 11 Özcan, L.; Şahin, Y. Determination of Paracetamol Based on Electropolymerized-Molecularly Imprinted Polypyrrole Modified Pencil Graphite Electrode. *Sensors Actuators, B Chem.* **2007**, *127*, 362–369.
- 12 Bahsi Oral, Z. B. Application of Mixed Self-Assembled Monolayers (Mixed SAMs) for Nucleic Acid Detection. *Measurement* **2016**, *94*, 1–4.
- 13 Richard D. Piner, Jin Zhu, Feng Xu, S. H.; Mirkin, C. A. “Dip-Pen” Nanolithography. *Science (80)*. **1999**, *283*, 661–663.
- 14 Sun, S.; Zhang, M.; Li, Y.; He, X. A Molecularly Imprinted Polymer with Incorporated Graphene Oxide for Electrochemical Determination of Quercetin. *Sensors (Basel)*. **2013**, *13*, 5493–5506.
- 15 Zamborini, F. P., Bao, L., & Dasari, R. (2012). Nanoparticles in measurement science. *Analytical Chemistry*, *84*(2), 541–76.
- 16 Li, B. L., Luo, J. H., Luo, H. Q., & Li, N. B. (2013). A novel strategy for selective determination of d-penicillamine based on molecularly imprinted polypyrrole electrode via the electrochemical oxidation with ferrocyanide. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *186*, 96–102.
- 17 Tsai, T.-C.; Han, H.-Z.; Cheng, C.-C.; Chen, L.-C.; Chang, H.-C.; Chen, J.-J. J. Modification of Platinum Microelectrode with Molecularly Imprinted over-Oxidized Polypyrrole for Dopamine Measurement in Rat Striatum. *Sensors Actuators B Chem.* **2012**, *171*–172, 93–101.
- 18 Liang, H. J.; Ling, T. R.; Rick, J. F.; Chou, T. C. Molecularly imprinted electrochemical sensor able to enantioselectively recognize D and L-tyrosine. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 83–89.
- 19 Rozlosnik, N. New directions in medical biosensors employing electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 637–645.
- 20 Kimmel, D. W.; Leblanc, G.; Meschievitz, M. E.; Cliffel, D. E. Electrochemical Sensors and Biosensors. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 685–707.
- 21 Advincula, R. C. Engineering Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Materials: Developments and Challenges for Sensing and Separation Technologies. *Korean J. Chem. Eng.* **2011**, *28* (6), 1313–1321.
- 22 Lehninger, A.; L. Nelson, D. L.; and Cox M. M. Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York, 2nd edn, **1993**, 128
- 23 Lehninger, A.; L. Nelson, D. L.; and Cox M. M. Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York, 2nd edn, **1993**, 131
- 24 Kong, Y.; Zhao, W.; Yao, S.; Xu, J.; Wang, W.; Chen, Z. Molecularly Imprinted Polypyrrole Prepared by Electrodeposition for the Selective Recognition of Tryptophan Enantiomers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**.
- 25 Ramanaviciene, A.; Ramanavicius, A. Molecularly Imprinted Polypyrrole-Based Synthetic Receptor for Direct Detection of Bovine Leukemia Virus Glycoproteins. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 1076–1082.
- 26 Arizabaleta, C. Uso de Polimeros Conductores Como Sensores Electroquimicos Basados En El Concepto de Impresion Molecular, Universidad del Valle, 2014, 35
- 27 Kuiken, K. A.; Lyman, M. With the Technical Assistance of Shirley Dieterich, Marjory Bradford, and Mary Trant. **1947**.
- 28 Benavides, E. et al. I Simposio Regional de electroquímica. Detección amperométrica de dopamina usando un electrodo de oro modificado con polipirrol sobreoxidado mediante la tecnología de impresión molecular. Universidad Santiago de Cali (**2016**).

- 29 Brummer, S. B.; Makrides, A. C. Surface Oxidation of Gold Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **1964**, 1122–1128.
- 30 Liu, Y.; Xu, L. Electrochemical Sensor for Tryptophan Determination Based on Copper-Cobalt Hexacyanoferrate Film Modified Graphite Electrode. *Sensors* **2007**, 7, 2446–2457.
- 31 Fan, Y.; Liu, J. H.; Lu, H. T.; Zhang, Q. Electrochemistry and Voltammetric Determination of L-Tryptophan and L-Tyrosine Using a Glassy Carbon Electrode Modified with a Nafion/TiO₂-Graphene Composite Film. *Microchim. Acta* **2011**.
- 32 Otero, T. F.; Márquez, M.; Suárez, I. J. Polypyrrole: Diffusion Coefficients and Degradation by Overoxidation. *J. Phys. Chem. B* **2004**.
- 33 Zhou, M. Electropolymerization of Pyrrole and Electrochemical Study of Polypyrrole . 2 . Influence of Acidity on the Formation of Polypyrrole and the Multipathway Mechanism. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 8443–8450
- 34 Le Floc'h, N.; Otten, W.; Merlot, E. Tryptophan Metabolism, from Nutrition to Potential Therapeutic Applications. *Amino Acids* **2011**.
- 35 Arizabaleta, C. Uso de Polímeros Conductores Como Sensores Electroquímicos Basados En El Concepto de Impresión Molecular, Universidad del Valle, 2014, 35
- 36 Miller, J; Miller, J. Estadística y quimiometría para química analítica, Prentice Hall, España, 4 ed, **2002**, 125
- 37 Özcan, A.; Yücel, S. A novel approach for the selective determination of tryptophan in blood serum in the presence of tyrosine based on the electrochemical reduction of oxidation product of tryptophan formed in situ on graphite electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 31, 26–31.

